UNIVERSITA' DI PISA
Istituto di Patologia Vegetale e di Microbiologia Agraria e Tecnica
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

426

E. AQUARONE

PRODUZIONE MICROBIOLOGICA DI RIBOFLAVINA

(Nota sintetica)

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » - N. 4 - Aprile 1961

NSP
RAT
MM

Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
15 NOV 1962

UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

426

E. AQUARONE

PRODUZIONE MICROBIOLOGICA DI RIBOFLAVINA

(Nota sintetica)

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » - N. 4 - Aprile 1961

TIPOGRAFIA EDITRICE COMM. U. GIARDINI - PISA

RIASSUNTO. — E' una Nota riassuntiva che informa intorno alla sintesi microbica della riboflavina con particolare riferimento ai microrganismi utilizzati dall' industria.

La produzione industriale di riboflavina, come quella di altre vitamine, è ancor oggi legata all'attività dei microrganismi.

Sono infatti numerose le specie microbiche capaci di tale attività anche se, per motivi di rendimento, solo poche vengono utilizzate dall'indudstria. Esse sono riferite in parte a Schizomiceti, in parte a Funghi. Delle une e delle altre diamo qui rapido cenno.

IL GRUPPO DEI CLOSTRIDI

In questo gruppo si annovera:

— *Clostridium acetobutylicum* Mc Coy et al.
— *Clostridium felsineum* (Carbone et Tombolato) Bergey et al.
— *Clostridium roseum* Mc Coy et Mc Clung

ed inoltre:

— *Cl. propyl-butylicum* Muller et Legg
— *Cl. saccharobutyl-acetonicum* Loughlin

considerati probabili sinonimi di *Cl. acetobutylicum* Mc Coy et al. Sono tutte specie che si riportano al gruppo fisiologico dei fermenti acetonobutilici e pertanto utilizzate nella produzione industriale dell'acetone e del butanolo, estraendosi la riboflavina, come sotto prodotto, dai residdui di lavorazione.

IL MEZZO DI COLTURA.

Vari sono i mezzi di coltura studiati come i più confacenti: mosto di mais (28), soja (92), orzo, avena, fecola di patate, melassa, siero di

latte (77), estratto di lievito (71); forse, il mosto di cereali, sembra il più confacente.

I mezzi sintetici danno bassi rendimenti (61, 91).

Nello studio relativo l'azione esercitata dai diversi elementi sopra la sintesi flavinica fu subito notata l'importanza del ferro (38, 71, 78) e fissata la sua concentrazione ottima intorno ad 1-3 ppm (mg 0,18-0,36 per litro di mosto). Concentrazioni diverse inibiscono la produzione di B_2 sì da rendere necessari preventivi trattamenti del mosto onde ridurre nelle giuste quantità la presenza di questo elemento.

Hickey (28) verificò che la 2,2'-bipiridina, formando nel mosto composti chelati biologicamente inattivi, riduce la concentrazione del ferro aumentando conseguentemente la produzione di riboflavina. Altri Autori (91) hanno trovato parimenti efficiente la fitina. Rodgers e coll. (78) intesero invece risolvere il problema cercando di selezionare ceppi resistenti al ferro.

Ancora altri Autori pensarono di rimuovere il ferro meccanicamente per mezzo del magnetismo (24) ed altri ancora addizionando particolari ioni quali (68, 69):

— il gruppo NH_4 nella proporzione di 1-5 ppm per presenza di ferro pari a 1-2,5 ppm
— il magnesio, in un suo sale solubile, nella proporzione di 120 ppm per 2 o più ppm di ferro
— lo zinco, anch'esso sotto forma di sale solubile, nella quantità di 0,15-3,5 ppm quando il ferro sia presente non oltre 1 ppm
— il manganese, sotto forma di sale solubile, nella proporzione di 0,05-20 ppm per 0,5-4,5 ppm di ferro.

Una serie numerosa di sostanze sono state quindi saggiate in vista di aumentare il rendimento vitaminico dei Clostridi (32, 71, 91, 92) ottenendosi risultati favorevoli, nulli o addirittura non favorevoli conforme quanto è indicato in Tabella.

Influenza del pH

E' richiesto che il pH sia e si mantenga entro 6-7.

Ciò si ottiene aggiungendo prima o durante la fermentazione idrossido di calcio, sodio o potassio. Normalmente si usa però carbonato di

calcio nella quantità dello 0,1-0,3% anche perchè, tale composto, presenta il vantaggio di bloccare eventuali tracce di ferro.

Azione di diverse sostanze sulla flavinogenesi dei Clostridi

Azione favorevole	Azione nulla	Azione inibente
crusca di riso 1%	lisina	$CaCl_2$
peptone idrolizzato con H_2SO_4 35% per 7-8 ore e neutr.to	inositolo	$FeSO_4$
biotina	istidina	Na_3AsO_4
tiamina	tirosina	$Co(NO_3)_2$
piridossina	alanina	$NiSO_4$
nicotinamide	leucina	H_2O_2
ac. p-aminobenzoico	glicina	J
ac. pantotenico	cistina	
arginina con asparagina	urea	
ac. aspartico	farina di mais	
ac. glutamico (secondo taluni)	triptofano	
xilosio	$LiSO_4$	
	$MgSO_4$	
	$Sr(NO_3)_2$	
	$BaCO_3$	
	$Ag\ NO_3$	
	$CaCO_3$	

STERILIZZAZIONE DEL MOSTO (71)

Nel caso di mosti zuccherini la sterilizzazione, a pressione e a 121°C. si continua per 15-20 minuti.

Se trattasi di mosti amilacei la autoclavatura deve prolungarsi per più lungo tempo al fine di conseguire l'idrolisi dell'amido.

INOCULAZIONE (24, 71, 78)

Si opera con colture pure usando una massa di inoculo in quantità relativamente elevata (circa il 4% del mosto) (24). E' necessario che la coltura di inoculo sia molto giovane, di non più di 5 ore attenuandosi nelle colture vecchie l'attitudine a formare riboflavina (78). Come ceppo di alto rendimento è dato l'ATCC-4259-E di Mc Coy (Razza T).

FERMENTAZIONE (71)

Si effettua alla temperatura di 37-40°C. secondo il ceppo usato e dura da 48 a 72 ore. Sono da escludersi recipienti in ferro.

RENDIMENTO (71, 78)

Il rendimento normale è di mg 50 di B_2 per litro. RODGERS a mezzo di razze resistenti al ferro, ottenne fino a mg 78/l.

ESTRAZIONE DELLA RIBOFLAVINA (24).

Essendo un sottoprodotto della fermentazione acetono-butilica essa si estrae dal residuo lasciato dalla distillazione frazionata dell'acetone e del butanolo.

IL GRUPPO DELLE CANDIDA

Sono date come produttrici di riboflavina, e pertanto utilizzate industrialmente *Candida guilliermondii* (Cast.) Langeron et Guerra, *Candida flareri* (Cif. et Red.) Lang. et Guerra (=*Torulopsis candida* (Saito) Lodder), *Candida parapsilopsis* (Ashf.) Langeron et Talice, *Candida tropicalis* var. *Rhagii* Diddens et Lodder (79, 80) oggi ritenuta sinonimo di *C. guilliermondii*.

Non sembra flavinogena *C. guilliermondii* var. *nitratofila* Diddens et Lodder (79) del resto data come sinonimo, oggi, di *Candida utilis* (Henn.) Lodder et Kreger-van Rij.

IL MEZZO DI COLTURA.

I mezzi consigliati per *Candida* sono generalmente mezzi sintetici, in ogni caso notandosi l'esigenza — comune ai Clostridi — di un molto basso contenuto in ferro (88) e l'inverso rapporto tra flavinogenesi e sviluppo microbico (7).

Un mezzo tipico, patentato già dal 1944 è, per *C. guilliermondii*, il seguente (7, 71).

	g/l		ppm (*)
KH_2PO_4	0,5	B	0,01
$MsSO_4 . 7H_2O$	0,5	Mn	0,01
$CaCl_2 . 2H_2O$	0,3	Zn	0,07
KJ	0,1	Cu	0,01
asparagina	2	Mo	0,01
glucosio	20	Fe	0,01
$(NH_4)_2 SO_4$	2	Biotina	1

(*) Gli elementi minerali sotto forma di sali solubili (generalmente cloruri).

Più recentemente (16) è stato proposto questo altro mezzo:

$(NH_4)_2 H PO_4$	g/l	3	$KH_2 PO_4$	g/l	0,2
$Mg SO_4 . 7 H_2O$	g/l	0,25	biotina	mcg/l	5

Per *C. flareri* il solfato ammonico deve essere sostituito da urea (circa 0,85 g/l). (24)

FATTORI INFLUENTI.

Non poche esperienze informano intorno alle varie influenze esercitate dai più diversi composti sulla capacità flavinogenetica delle specie di *Candida*.

Per quanto si riferisce alle sorgenti di carbonio le migliori sono rappresentate, nell'ordine, da levulosio, glucosio, saccarosio, mannosio (20 g/l). Seguono, con minor rendimento, xilosio, arabinosio, sorbosio, inulina, glicerina, mannite. Maltosio e lattosio sono da escludersi (71, 79).

Circa la fonte di azoto possono essere utilizzati sali di ammonio, urea, glicina, metionina e asparagina (7, 8, 37, 71, 79). Quest'ultima, nella concentrazione di g1/l sembra addirittura un fattore indispensabile (80). Danno minori rese: glicocolla e ac. glutamico. Idrolisato di caseina ed estratto di lievito favoriscono l'accrescimento della massa microbica, ma riducono il rendimento in B_2. In quanto agli elementi minerali fondamentali le forme meglio indicate sono le seguenti:

per il fosforo: H_3PO_4 - K_2HPO_4 - $(NH_4)_3PO_4$

per lo solfo: $MgSO_4$ - Na_2SO_4 - K_2SO_4

per il potassio: K_2HPO_4 - K_2SO_4

per il magnesio: $MgSO_4$ - $MgCl_2$ - $Mg(NO_3)_2$

Aggiunte di tiamina, purine e pirimidine alla biotina (23, 33, 80) e così aggiunte di alcuni aminoacidi (7) sono senza effetto.

D'altra parte la biotina deve essere aggiunta tratandosi di microrganismi biotino-eterotrofi.

L'addizione di microelementi quali Cu, Co, Mn, Mo, V, Be, Ni, non sembra esercitare importante influenza (33); piccole aggiunte di KCN o HCN dopo 24 ore dall'inizio della fermentazione sembrano invece influire favorevolmente (71).

LA PARTICOLARE INFLUENZA DEL FERRO E DELLO ZINCO.

Il grado di tolleranza delle *Candida* per il ferro è, dal punto di vista delle rese in B_2, molto inferiore di quello presentato dai Clostridi. Non tutti gli Aa sono peraltro concordi nello stabilire i limiti di tale tolleranza anche se i più danno tali limiti compresi tra i 5 e i 60 mcg/l (23, 24, 37, 71, 82, 83, 88) con preferenza ai 10 mcg/l.

D'altra parte ENARI (24) afferma che in presenza di mg 1 circa di cobalto per 100 ml di mosto la quantità di ferro tollerata aumenta di circa 10 volte; mentre altri (83) hanno trovato che l'influenza negativa del ferro si attenua o scompare allorquando si semini con cellule adulte. Di contro la catalasi — a differenza di quanto avviene per i Clostridi — non rimuove la inibizione ferrica (33).

In ogni caso, qualora non si impieghino sostanze pure (71), esistono procedimenti atti a ridurre la quantità di ferro presente nel mezzo. Uno di questi consiste nell'aggiungere al mosto 8-idrossichinoleina in soluzione cloroformica e quindi estrarre il complesso che si forma con $CHCl_3$ fino a che questo non rimane incolore (24, 71).

Altro metodo, di impiego industriale, è quello di trattare il mosto con apparecchi scambiatori di ioni contenenti adatte resine quale, ad es., la « Nalcite X » (24, 71).

All'opposto del ferro lo zinco, secondo diversi Aa (24, 33, 71) è elemento indispensabile alla attività flavinogenica di *Candida*.

Secondo KNÜSEL la sovraproduzione di vitamina B_2 da parte di questi germi deve essere addirittura considerata come una anomalia biochimica provocata dallo zinco; in altri termini un prodotto secondario legato ad una deviazione metabolica causata da questo elemento.

La concentrazione in zinco indicata nel già ricordato mezzo in mg/l = 0,07 dovrebbe pertanto, secondo alcuni, essere aumentata da 3 a 11 volte.

STERILIZZAZIONE DEL MOSTO.

Mentre alcuni Autori (71) suggeriscono di sterilizzare il mezzo a 126°C. per 15 minuti, altri (24, 37) affermano che ciò non è necessario in quanto il pH dello stesso mezzo scende rapidamente intorno a 3-3,5.

La possibilità di condurre la fermentazione in mezzo non sterile riveste per la pratica notevole interesse.

INFLUENZA DEL pH.

Il pH del mezzo dovrebbe essere compreso tra 4,5 (16) e 6 (16, 24). Forse un pH = 5 è quello che dà il migliore risultato (16, 24, 33). Il pH finale si aggira sempre verso pH 3,5 (24, 33).

INOCULAZIONE.

La quantità di inoculo sembra abbia influenza sulla produzione di B_2. BURKHOLDER (7) dopo avere sperimentato quantità di inoculo fino ad 1,2 g/l la indica in g. 0,12/litro; altri, lavorando in scala pilota (24, 37) inoculano con 1% di una coltura madre sviluppatasi nello stesso mezzo.

CONDOTTA DELLA FERMENTAZIONE.

La fermentazione è condotta a 30°C. (7, 8, 16, 71). E' da tenere presente che una energica agitazione accompagnata da aereazione aumenta considerevolmente la resa del prodotto (7, 8, 16, 24, 71) riducendo il tempo di fermentazione da sette a cinque giorni.

LEVINE (24, 37) lavorando in scala pilota immette aria umida filtrata attraverso lana di vetro e mantiene l'agitatore alla velocità di 760-790 giri per minuto. In ogni caso la fermentazione deve essere realizzata, per ovvi motivi, in recipienti che non siano nè di ferro nè di acciaio, bensì di materiale plastico o di alluminio (24).

ESTRAZIONE DELLA RIBOFLAVINA.

Esistono vari mezzi patentati (71):

a) estrazione con butanolo

b) precipitazione per via chimica.

c) adsorbimento su terra d'infusori ed eluzione con una soluzione di una base organica in una aldeide.

d) conversione della riboflavina in una forma meno solubile per azione di batteri riduttori come *Staphilococcus foecalis* o *Escherichia coli*; sembra che così precipiti più del 90% di vit. B_2 cristallizzata (29).

e) uso di agenti riduttori inorganici come ditionite, sali stannosi, ecc. (29).

RENDIMENTO.

Il rendimento in B_2 raggiunge i 100 mg/l con *C. guilliermondii* e mg 325/l con *C. flareri* (24, 37).

ASHBYA GOSSYPII

In origine, come noto, *Ashbya gossypii* fu descritta come agente patogeno del cotone. Ma GUILLIERMOND osservò che alcuni ceppi erano capaci di sintetizzare riboflavina e in quantità così notevoli da poter essere utilizzati nella produzione di questa vitamina. Attualmente, infatti, *A. gossypii* è, in ceppi opportunamente selezionati, uno dei due microrganismi più utilizzati dall'industria (74). Tali ceppi diremo subito, si presentano assai più stabili di quelli di *Eremothecium ashbyi* (v. oltre) potendosi anche, sotto determinate condizioni, mantenere liofilizzati (24).

IL MEZZO DI COLTURA.

Molti Aa. (4, 24, 40, 65, 71, 72, 84, 89, 90, 104) indicano che il glucosio è il miglior carboidrato per la preparazione del mosto. Tuttavia può essere usato anche levulosio, maltosio, saccarosio e cellobiosio. Non sono utilizzabili i pentosi; nè lo sono galattosio, lattosio, inulina, cellulosa, amido, melassa.

Le concentrazioni consigliate vanno da 10 a 40 g. per litro, ma la maggior parte indica come migliore quella di g. 20/litro. Come fonte di azoto il composto più indicato (4, 24, 40, 71, 72, 89) è il peptone nella quantità di g. 5/litro o l'estratto di lievito g. 3/l.

Nell'industria il peptone viene peraltro sostituito, per economia, con i residui di macello.

In definitiva si possono avere i seguenti mezzi:

a) per colture di mantenimento:

glucosio	10	estratto di malto	3
peptone	5	agar	20
estratto lievito	3	acqua	1000

b) per colture da inoculo:

glucosio	20	acqua di lavaggio di mais	10
peptone	5	acqua	1000

o colture intermediarie:

glucosio	20	acqua di lavaggio di mais	10
animal stick liquor . . .	5	acqua	1000

c) di fermentazione o industriale:

glucosio	20-40	acqua di mais	5-25
peptone	5- 7	acqua	1000
(o animal stick) . . .	5-10	agente antispuma . . .	1-2

Recentemente (1, 24) una patente inglese indica come vantaggiosa la sostituzione dello zucchero, quale sorgente di carbonio, con un grasso come ad es. l'olio di mais (1 g/l). Così operando sembra tra l'altro che divenga flavinogenetica anche la sorgente alimentare proteica con un aumento del 25% della produzione.

Sembra altresì utile secondo PRIDHAM (72), aggiungere il carboidrato frazionatamente in più volte.

Sperimentalmente sono stati saggiati anche mezzi sintetici (19), ma questi sembra che favoriscano più lo sviluppo del germe che la sua attività flavogenica a meno che non si addizionino di acetato di ammonio e di Tween 80.

Questa, d'altra parte, è stimolata dalle seguenti sostanze (1, 24, 71, 85, 103, 104): biotina, tiamina, inositolo, ac. propionico e propionati nella concentrazione non superiore ai 75-250 mg/l, nitrato di cobalto non in quantità superiore ai mg 10/l, $CaCO_3$ e $CaHPO_3$ nella proporzione di 1-10 g/l, agenti tensioattivi, sale sodico del 2, 4, 6-triclorofenolo, ecc. Giovano inoltre, perchè dimostratisi con la tecnica del C radioattivo precursori di riboflavina, formiati, acetati, glicina e metilene (2).

Di contro ioni inorganici non sembrano avere alcuna influenza, neppure negativa (73), mentre gli acidi nicotinico e naftalenacetico esercitano azione inibente (4).

STERILIZZAZIONE.

La sterilizzazione del mosto è necessaria (84). Secondo i più (24, 71, 89, 90) deve essere peraltro evitata una autoclavatura lenta. Usualmente si opera a 121°C. per 15-30 minuti. Sembra tuttavia che sia preferibile autoclavare a 138-147° per 3 soli minuti (24, 71).

INFLUENZA DEL pH.

La maggior parte degli Aa (4, 24, 40, 71, 90) indica che il pH iniziale deve essere compreso tra i valori di 6-7,5 risultando forse migliore un pH di 6,5.

Durante la fermentazione il pH si abbassa durante il consumo del glucosio fino a 4,7, per poi risalire a 6,5. La produzione di riboflavina avviene in questa seconda fase e segue in parallelo l'innalzarsi del pH.

INOCULAZIONE

Gli Aa. (24, 40, 71, 89, 90) sono concordi nello stabilire che:

a) l'inoculo deve essere costituito da colture giovani di 20-48 h;

b) il volume dell'inoculo deve essere piccolo, cioè compreso tra lo 0,1 o l' 1,1%; concentrazioni maggiori sortono effetto negativo fino ad annullarsi ogni attività flavinogenetica quando l'inoculo salga al 10%.

Il materiale d'inoculo si prepara coltivando il germe nel già indicato mezzo *b*); si passa quindi nel mezzo intermedio e infine in quello di fermentazione. Del resto può anche prepararsi utilizzando subito lo stesso mezzo di fermentazione.

CONDOTTA DELLA FERMENTAZIONE.

La fermentazione viene condotta in recipienti di alluminio, rame o acciaio inossidabile alla temperatura di 26-30°C., preferibilmente a 28°C. (4, 24, 71, 89, 90) e dura 90-192 ore.

E' necessaria areazione e (o) agitazione meccanica. Praticamente è sufficiente agitare le colture di inoculo o le colture intermedie e arieggiare solamente il mosto. La condotta dell'arieggiamento (naturalmente con aria sterile) deve essere controllata poichè, un'eccessiva introduzione d'aria può impedire l'accrescimento del micelio. La quantità di aria da introdursi deve quindi essere contenuta entro 0,2-0,5 litri per

litro di mosto e a minuto (4, 24, 45, 71, 90, 104). Recentemente è stato progettato uno speciale apparecchio (40) che consente di realizzare agitazione e arieggiamento in un sistema chiuso.

RENDIMENTO.

Il rendimento varia in rapporto alla natura del mosto e al metodo seguito. In generale è di 500-600 mg/l; ma se, impiegandosi glucosio, questo viene aggiunto durante la fermentazione, si può salire allora a 1700 mg/l; o anche a 2000 mg/l qualora si impieghi olio di mais.

ESTRAZIONE.

Oltre ai metodi già menzionati a proposito di *Candida* Ayerra (4) recupera la vitamina B_2 per adsorbimento con carbone o bentonite ed eluizione con acetone o glicerolo.

Per altri processi vedi UNDERKOFLER e HICKEY (102).

EREMOTHECIUM ASBHYII

E' questa una delle altre specie che, in ceppi selezionati (3, 12, 77) produce quantità notevoli di riboflavina.

Tale produzione si trova correlazionata, in *E. ashbyii*, all'attività fisiologica del fungo e si svolge secondo fasi, distinte. In un recente studio STARKA (86) distingue le quattro fasi seguenti. Nella prima (0-36h) con il consumo completo dello zucchero si raggiunge il limite massimo di sviluppo, ma scarsa è la formazione di B_2. Nella seconda (36-60h) inizia la sporulazione, diminuisce l'attività respiratoria, aumenta l'attività catalasica: intenso è il processo di sintesi della riboflavina. In terza fase (60 h-7 gg.) si raggiunge il massimo di attività catalasica mentre si accumula nella cellula glicogeno e volutina. Nell'ultima fase tutte le variabili studiate sembrano avere raggiunto un equilibrio stabile. In definitiva è a pensarsi che la sintesi della riboflavina abbia luogo a termine dell'accrescimento e corrisponda ad un passaggio metabolico del sistema respiratorio citocromico al sistema flavino-ossidasico.

IL MEZZO DI COLTURA.

Varie sono state le ricerche intorno al mezzo di coltura con particolare riferimento ai mezzi naturali e numerosi gli studi intesi ad aumentare il rendimento in vitamina in rapporto alla composizione dello stesso.

Naturalmente l'attenzione maggiore fu rivolta alla sorgente di carbonio e di azoto. Ma, indipendentemente da ogni singola influenza, in ogni caso è stato osservato: *a*) la produzione di riboflavina è maggiore quando si stabiliscono condizioni di cattiva nutrizione (95); *b*) che nessuna relazione esiste tra sviluppo del germe e flavinogenesi ma, all'opposto, i fattori che incrementano lo sviluppo generalmente non favoriscono la produzione di B_2 (51, 56, 62); *c*) nessuna negativa influenza esercita la presenza del ferro nel mezzo di coltura come, in contrario, si è visto per gli altri microrganismi (24) *Ashbya* esclusa.

In particolare:

Sorgente di carbonio. Buoni risultati sono stati ottenuti (27, 36, 50, 51, 52, 58) con glucosio, maltosio e saccarosio nelle concentrazioni del 2,5-15‰; e, tra i prodotti naturali, gli zuccheri presenti nella melassa di canna e nello sciroppo di mais. I migliori rendimenti sono stati avuti, peraltro, con glucosio (26, 31, 81) e con melassa di canna (93, 98) sia in piccolo che su scala industriale (14, 100). Con maltosio, a parte il pur buon rendimento che si ottiene, si ha anche il vantaggio di poter lavorare a temperatura ambiente (58) e di fatto, nella pratica, molti usano glucosio e maltosio associati.

Sorgente di azoto. Si impiega di norma azoto proteico tratto da animali (fegato, pancreas, milza, polmoni, farina di sardina, visceri di pesce, caseina, farina di molluschi, siero di latte, ecc.) nella concentrazione di 10-50 g/l (26, 27, 36, 50, 51, 52, 58, 71, 98). Possono però essere utilizzate anche sorgenti azotate vegetali come embrioni di cereali, estratti di patata, loppa di riso, farina di soia, estratto di lievito (31, 39, 62, 81, 98). Invero gli embrioni vegetali appaiono troppo ricchi in ceneri il che comporta o l'impiego di ceppi tolleranti elevate concentrazioni osmotiche (35, 54, 87, 101) o la loro parziale eliminazione.

Ad ogni modo le migliori sorgenti alimentari azotate sembrano la farina di pesce (93, 97, 98) o la loppa di riso (39).

E' ancora a dirsi che l'aggiunta di un corpo grasso come burro (g 50/l) od oleato di sodio (g 0,6/l) influisce favorevolmente sul rendimento (26, 30, 66, 67).

Influenza di altri composti.

Le numerose ricerche al riguardo hanno messo in evidenza che sortono esito favorevole: solfato di zinco, solfato di magnesio, fosfato acido di potassio, tiamina, biotina, piridossina, ac. pantotenico, fitina e, soprattutto, inositolo (15, 30, 46, 47, 48, 81). Quindi, tra gli aminoacidi, si elenca: metionina, tirosina, glicocolla e soprattutto istidina (20, 21, 81, 105).

Recentemente HICKEY (30) ha rimarcata la indispensabilità di due fattori, denominati A e B rispettivamente tratti da estratto di lievito e da caseina. Tanto sembra confermato, più di recente, da altri ricercatori (75) che hanno ottenuto ottimi rendimenti proprio aggiungendo al mezzo idrolizzato di lievito o di proteine.

E' stata studiata anche l'azione di possibili precursori trovandosi stimolanti guanina, xantina, e in particolare adenina (6, 22, 41, 43, 44, 49). L'uracile si comporta secondo alcuni come inibente (41) secondo altri come stimolante (49). Le amine ora sono favorevoli (cadaverina, putrescina, aminoetilamina), ora sfavorevoli (istamina, tiramina) (57). Per l'azione di altri composti vedi un esauriente lavoro di BROWN e coll. (5).

In definitiva sono quindi consigliati i mezzi seguenti (30, 67):

— Mezzo di conservazione:

glucosio	12	estratto lievito	1
maltosio	8	agar	15
tripticasi	15	acqua	1000

— Mezzo di inoculo:

glucosio	10	estratto lievito	1
peptone	10	acqua	1000
estratto carne	2		

— Mezzo di fermentazione:

glutamato di sodio 20 g/l; maltosio 10 g/l; glucosio 15 g/l; K_2HPO_4 1 g/l; KH_2PO_4 1 g/l; Mg $SO_4 . 7 H_2O$ 700 mg/l; oleato di sodio 600 mg l; inositolo 30 mg/l; tiamina 1,5 mg/l; biotina 0,7 mcg/l.

STERILIZZAZIONE DEL MOSTO.

I metodi di sterilizzazione sono in rapporto alla natura del mosto usato. Nella generalità dei casi si procede tuttavia mediante autoclavatura a 121°C. per 15 o più minuti (24, 30, 39, 41, 96); in alcuni casi (11) è consigliabile tindalizzare.

E' stato anche proposto l'impiego di antisettici (55) incluso penicillina in dosi di 0,5-40 U/ml (24).

INFLUENZA DEL pH.

Il pH iniziale del mosto varia generalmente tra 5,5 e 6,5 (11, 14, 34, 41, 58, 59, 94) per cui, dopo sterilizzazione, deve sempre controllarsi ed aggiustarsi. Qualora all'aggiustamento a pH 7 si proceda durante la fase intermedia della fermentazione sembra che il rendimento aumenti del 30% (53).

INOCULAZIONE.

La maggior parte degli Aa. consiglia di usare lo 0,5-1% di inoculo (15, 39, 41, 94). HENDRICKS e coll. affermano che possono essere usate anche quantità molto minori (26) specie se la cultura madre proviene da un mezzo altamente flavinogenico (24).

Qualche parere discorde esiste nei riguardi dell'età che deve avere la coltura di inoculo: secondo alcuni si debbono usare colture giovani (94), addirittura di 48 ore (15); secondo altri si possono usare anche colture di 5 giorni (105) o di dieci (39).

CONDOTTA DELLA FERMENTAZIONE.

Salvo qualche eccezione (15) i più concordano che i migliori rendimenti si hanno conducendo la fermentazione con arieggiamento e agitazione in colture sommerse (13, 14, 24, 58, 66, 71). E' anche vero che taluno ha però trovato più vantaggioso procedere con colture superficiali (3).

La temperatura di fermentazione deve essere mantenuta tra i 20 e i 35°C., meglio sui 28° (14, 15, 24, 26, 30, 58, 66, 71, 81).

Secondo alcuni giova l'oscurità (81), mentre altri (34) hanno osservato l'esistenza di una relazione inversamente proporzionale tra pressione osmotica del mezzo e produzione di riboflavina.

La durata della fermentazione è variabile: da 50 ore a 20 giorni (3, 13, 14, 24, 26, 30, 66, 71, 76, 87). Praticamente non termina prima dei 10 giorni nelle colture statiche; si completa invece entro 5 giorni nelle colture agitate.

L'arieggiamento (71) deve essere proporzionato alla superficie del mezzo. L'aggiunta di antispuma, infine, è trovato sempre opportuno.

RENDIMENTO.

La resa in riboflavina varia enormemente in rapporto ai molti fattori influenti: da 500 mcg/litro (66) a 5 g litro di mosto (11) o altrimenti, come taluno afferma, mg 264 - g 1 per 100 grammi di sostanza secca.

ESTRAZIONE.

Valgono i metodi già ricordati a proposito degli altri microrganismi. In più POVOLOSKAYA (70) ricorda che si può estrarre la B_2 precipitando con $Na_2S_2O_4$ a pH 5,6 e assorbendo la residua con ascanite. PÉNEAU e coll. hanno patentato il seguente metodo (64): separazione del corpo microbico per centrifugazione; trattamento del liquido acidificato con m-p-cresolo; lavaggio della soluzione di cresolo con acqua e precipitazione della vitamina con acetone. Se ne estrae il 40-50% del totale. Il residuo è recuperato attraverso un secondo trattamento con cresolo che ne estrae ancora il 20-25% mentre il rimanente 5-10% viene adsorbito con solfuro di piombo.

ALTRI MICRORGANISMI FLAVINOGENETICI

Tra gli Schizomiceti sono stati trovati flavinogenetici:

— *Alcaligenes foecalis* da MORISHITA (10); la produzione di B_2 è intra- ed extracellulare.

— *Streptococcus foecalis* (9).

— *Bac. subtilis* e *Proteus vulgaris* (10) per aggiunta di sulfatiazol al mezzo di coltura. E' produzione extracellulare (60).

E' ancora da ricordarsi che GANGULY (17) ha descritto un batterio non identificato, isolato dall'aria, coccoide, gramnegativo, capace di produrre 250 mg/l di riboflavina.

Altri funghi, principalmente del genere *Fusarium* e *Aspergilius*, hanno mostrato capacità per produrre riboflavina (63) in quantità variabili.

Il *Mycobacterium smegmatis* produsse più di 135 mg/l in un mezzo in cui la fonte d'azoto è inorganica e il carbonio è dato da glicerolo, arabinosio o levulosio (42).

Tra i Lieviti varie specie sono state trovate capaci di produrre riboflavina (25) ma nessuna in quantità praticamente interessante all'infuori forse di una specie di *Rhodotorula* e di un ceppo di *Sacch. cerevisiae* (18).

E. AQUARONE

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa

BIBLIOGRAFIA

1 - AMERICAN CYANAMID Co. - *Riboflavin*: Brevetto 760.072 (Inghilterra) del 1956 (ref. Chem. Abst. *52*, 1556f, 1958).

2 - ANONIMO - *Riboflavin biosynthesis*. Nutr Rev. *14*, 250, 1951 (ref. Bull. Inst. Past. 55 (1), 1915, 1957).

3 - ARRAGON, G. e Coll. - *La Flavinogénése par « Eremothecium ashbyii » Guillermond. Étude du Facteur Surface/Volume*. Ann. Inst. Past. 72, 300, 1946.

4 - AYERRA B. L. -*Production of Riboflavin by Fermentation and its Microbiological Assay*. Rev. Fac. Cienc. Quim. Univ. La Plata, *28*, 95, 1953-54 (ref. Chem. Abst. *51*, 14205g, 1957).

5 - BROWN, E. G. e Coll. - *Studies on the Biosyinthesis of Riboflavin. 2-Further Observations on Nitrogen Metabolism and Flavinogenesis in « Eremothecium ashbyii »*. Biochem. J. *61*, (1), 37, 1955.

6 - BROWN, E. G. e Coll. - *Studies on the Biosynthesis of Riboflavin. 4-Purine Metabolism and Riboflavin Synthesis in « Eremothecium ashbyii »*. Biochem. J. *68*, 40, 1958.

7 - BURKHOLDER, P. - *Influence of Some Environmental Factors Upon the Production of Riboflavin by a Yeast*. Arch. Biochem. *3*, 121, 1943.

8 - BURKHOLDER, P. - *Synthesis of Riboflavin by a Yeast*. Proceed. Nation. Acad. Sci. Amer., *29*, 166, 1943 (ref. Bull. Inst. Past., *46*, 408, 1948).

9 - CLAPPER, W. E. e MEADE, G. H. - *Relation of Folic Acid Concentration of Medium to Riboflavin Metabolism of « Streptococcus faecalis »*. J. Bacteriol., *76*, 48, 1958.

10 - CRANDALL, R. E. - *The Effect of Sulfathiazole on the Rate of Increase of Riboflavin Production by « Proteus vulgaris » and « Bacillus subtilis »*. J. Bacteriol., *55*, 833, 1948.

11 - DESEIVE, E. - *Information on the Production of Lactoflavin by « Eremothecium ashbyii »*. Milchwissenschaft. *2*, 141, 1947 (ref. Biol. Abst., *23*, 11529, 1949).

12 - DIKANSKAYA, E. M. - *Production de Riboflavine par le Champignon Microscopique « Eremothecium ashbyii »*. Troudy Inst. Mikrobiol., *3*, 35, 1954 (ref. Bull. Inst. Past., *54*, (1), 356, 1956).

13 - DIKANSKAYA, E. M. - *Conditions for Formation of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii »*. Troudy Vsesoyuz. Nauch. Issledovatel. Vitamin. Inst., *5*, 140, 1954 (ref. Chem. Abst., *51*, 7491c, 1957).

14 - DOI, S. e TSUBOUCHI, K - *Vitamin B_2*. Brevetto 8147 (Giappone) del 1955 (ref. Chem. Abst., *51*, 18493g, 1957).

15 - DULANEY, E. L. e GRUTTER, F. H. - *The Nutritional Requirements of « Eremothecium ashbyii » Guill.* Mycologia, *42*, 717, 1950.

16 - ENARI, T. - *Effect of Cobalt and Iron on Riboflavin Production by « Candida guilliermondii»*. Acta Chem. Scand., *9*, 1726, 1955.

17 - GANGULY, S. - *A Riboflavin-Producing Bacteria*. Nature, *174*, 559, 1954.

18 - GIRI, K. V. e KRISHNASWAMY, P. R. - *Studies on the Synthesis of Riboflavin by a Mutant Yeast, « Saccharomyces cerevisiae »*. J. Bacteriol., *67*, 309, 1954.

19 - GOODMAN, J. J. e FERRERA, R. R. - *Synthesis of Riboflavin by « Ashbya gossypii » Grown in a Synthetic Medium*. Mycologia, *46*, 556, 1954.

20 - GOODWIN, T. W. e PENDLINGTON, S. - *The Biosynthesis of Riboflavin in « Eremothecium ashbyii »*. Biochem. J., *56*, 24, 1953.

21 - GOODWIN, T. W. e PENDLINGTON, S. - *Studies on the Biosynthesis of Riboflavin*. Biochem. J., *57*, 631, 1954.

22 - GOODWIN, T. W. - *Riboflavin Synthesis by « Eremothecium ashbyii »*. Congr. Intern. Bioch. 3° Congress. Brussells 87, 1955, (ref Chem. Abst., *50*, 14052e, 1956).

23 - GOODWIN, T. W. e MC EVOY, D. - *Riboflavin Biosynthesis in « Candida flareri »*. Biochem. J., *67*, 160, 1957.

24 - GOODWIN, T. W. - *Progress in Industrial Microbiology*. Vol. 1, pag. 159; Hockenhull, Londra, 1959.

25 - HEDRICK, L. R. e BURKE. G. C. - *Yeasts from Hawaiian Fruit Flies: Their Identification and Ability to Produce Riboflavin*. J. Bacteriol., *59*, 481, 1950.

26 - HENDRICK, H. e VLEESCHAWER, A. - *The Use of Whey and Skim Milk for the Biosynthesis of Vitamin B_2 with « Eremothecium ashbyii ». Influence of the Quantity of Bacterial Culture*. Mededel. Landbouwhogeschool en Opzoekings. Staat Gent., *21*, 67, 1956 (ref. Chem. Abst., *51*, 6779c, 1957).

27 - HENDRICK, H. e VLEESCHAUWER, A. - *Influence of Certain Nutritive Constituents on the Biosynthesis of B_2.* 14 th. Intern. Dairy Congr. Proc. Rome 1956 (ref. Chem. Abst., *51*, 9959a, 1957).

28 - HICKEY, R. J. - *The Inactivation of Iron by 2,2'. Bipyridine and Its Effect on Riboflavin Synthesis by « Clostridium acetobutylicum ».* Arch. Biochem., *8*, 439, 1945.

29 - HICKEY, R. J. - *Precipitation of Riboflavin from Aqueous Solution by Bacteriological Reduction.* Arch. Biochem., *11*, 259, 1946.

30 - HICKEY, R. J. - *Some Nutritional Requirements for Biosynthesis of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii ».* J. Bacteriol., *66*, 27, 1953.

31 - HOLL, J. e Coll. - *Production of Riboflavin from Agricultural Residues.* Inds. Agr. et Aliment. (Paris), *73*, 519, 1956 (ref. Chem. Abst., *51*, 665d, 1957).

32 - KAZUTAMI, I. - *Formation of Riboflavin by Acetone-Butanol Fermentation Bacteria.* Mem. Coll. Agr. Kyoto Univer., *73*, 1, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 13363c, 1956).

33 - KNÜSEL, F. - *Die Biosynthese des Riboflavins bei « Candida Guilliermondii » (A. Cast.) Langeron und Guerra und Einigen Verwandten Arten. Einflub von Spurenelementen, Insbesondere von Eisen und Zink.* Arch. Mikrobiol., *27*, 219, 1957.

34 - KONSANSZKY A. - *Changes in Osmotic Pressure During Fermentation* I-*Relation of Changes in Osmotic Pressure to Vitamin B_2 Production.* Schweiz. Z. Allgem. Pathol. u. Bakteriol., *21*, 659, 1958 (ref. Chem. Abst., *52*, 14073d, 1958).

35 - KONSANSZKY, A. - *Changes in Osmotic Pressure During Fermentation.* II-*Changes in the Carbohydrate, Protein, and Organic Bound Nitrogen of the Medium as Well as the Osmotic Pressure During Fermentation.* Schweiz. Z. Allgem. Pathol. u Bakteriol., *21*, 662, 1958 (ref. Chem. Abst., *52*, 14073e, 1958).

36 - KOZIMA, T. - *Studies on the Riboflavin Production by «Eremothecium ashbyii».* J. Fermentation Tech., *28*, 129, 1950 (Biol. Abst., *26*, 9222, 1952).

37 - LEVINE, H. e coll. - *Riboflavin Produced by Candida Yeasts.* Ind. Eng. Chem., *41*, 1665, 1949.

38 - LEVITON, A. - *The Microbiological Synthesis of Riboflavin. A Theory Concerning its Inhibition.* J. Am. Chem. Soc., *68*, 835, 1946.

39 - LULLA, B. S. e JOHAR, D. S. - *Synthesis of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii ».* J. Sci. Ind. Research (India), *16c*, 45, 1957 (ref. Chem. Abst., *52*, 3910b, 1958).

40 - LUNDGREN, D. G. e RUSSELL, R. T. - *An Air Lift Laboratory Fermentor.* Appl. Microbiol., *4*, 31, 1956.

41 - MAC LAREN, J. A. - *The Effects of Certains Purines and Pyrimidines Upon the Production of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii ».* J. Bacteriol., *63*, 233, 1952.

42 - MAYER, R. L. e RODBART, M. - *Production of Vitamin B_2 by « Mycobacterium smegmatis ».* J. Bacteriol., *51*, 568, 1946.

43 - MC NUTT, W. S. - *The Direct Contribution of Adenine to the Biogenesis of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii ».* J. Biol. Chem., *210*, 511, 1954.

44 - Mc Nutt, W. S. - *The Incorporation of the Pyrimidine Ring of Adenine into the Isoalloxazine Ring of Riboflavin.* J. Biol. Chem., *219*, (1), 365, 1956.

45 - Mickelson, M. N. - *The Metabolism of Glucose by « Ashbya gossypii ».* J. Bacteriol., *59*, 659, 1950.

46 - Minoura, K. - *Studies on the Vitamin B_2 Production by « Eremothecium ashbyii ».* J. Fermentation Tech., *28*, 125, 1950 (ref. Biol. Abst., *26*, 9228, 1952).

47 - Minoura, K. - *Studies on the Vitamin B_2 Production by « Eremothecium ashbyii ».* J. Fermentation Tech., *28*, 186, 1950 (ref. Biol. Abst., *26*, 9228, 1952).

48 - Minoura, K. - *Studies on the Vitamin B_2 Production by « Eremothecium ashbyii ».* J. Fermentation Tech., *28*, 308, 1950 (ref. Biol. Abst., *26*, 9229, 1952).

49 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XXXIV-*Effect of Several Compounds for the Growth of Fungus and the Riboflavin Production.* Vitamins, *6*, 746, 1953 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321b, 1956).

50 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XXXV-*Effects of Carbon and Nitrogen Sources.* Vitamins, *6*, 914, 1953 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321c, 1956).

51 - Minoura, K. - *The Germination of the Spores of « Eremothecium ashbyii ».* J. Fermentation Tech., *33*, 526, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 9506a, 1956).

52 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XXXVII-*Nitrogen Sources for Industrial Production of Riboflavin.* Vitamins, *9*, 403, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321d, 1956).

53 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XXXVIII-*Effect of pH of the Medium.* Vitamins, *9*, 407, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321e, 1956).

54 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XXXIX-*Application of a New Strain of Fungi, Tolerant of High Osmotic Pressure.* Vitamins, *9*, 407, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321b, 1956).

55 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XL-*Trials to Prevent Contamination During Cultivation.* Vitamins, *9*, 414, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321g, 1956).

56 - Minoura, K. - *Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* XLI-*Effect of Growth Inhibitors on Riboflavin Formation.* Vitamins, *9*, 419, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 17321h, 1956).

57 - Miyaki, K. e coll. - *Effect of Biogenic Amines on Production of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii ».* J. Pharm. Soc. Japan, *75*, 1526, 1955 (ref. Chem. Abst., *50*, 5081h, 1956).

58 - Moore, H. N. e coll. - *Studies on « Eremothecium ashbyii ».* J. Bacteriol., *53*, 502, 1947.

59 - Moore, H. N. e Becze, G. - *Riboflavin Synthesis by « Eremothecium ashbyii » in Synthetic and Natural Substrates.* J. Bacteriol., *54*, 40, 1947.

60 - Morishita, M. - *Biosynthesis of Riboflavin by Intestinal Bacteria and its Distribution Inside and Outside of Bacteria.* Nagoya J. Med. Sci., *19*, 165, 1957 (ref. Bull. Inst. Past., *56*, (2), 2756, 1958).

61 - Obata, Y. e Tomoyeda, M. - J. Agric. Chem. Soc. (Giappone), 27, 867, 1953 (ref. Progress in Industrial Microbiology, *1*, 176, 1959).

62 - Osaki, I. e Karata, S. - *The Influence of Barley Sprouts on the Production of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii »*. J. Fermentation Tech., *29*, 181, 1951 (ref. Chem. Abst., *46*, 577f, 1952).

63 - Peltier, G. L. e Borchers, R. - *Riboflavin Production by Molds*. J. Bacteriol., *54*, 519, 1947.

64 - Péneau, H. e coll. - *Vitamin B_2*: brevetto 999.107 (Francia) del 1952 (ref. Chem. Abst., *50*, 14188a, 1956).

65 - Pfeifer, V. F. e coll. - *Riboflavin by Fermentation with « Ashbya gossypii »*. Ind. Eng. Chem., *42*, 1776, 1950.

66 - Phelps, A. - Brevetto 2.473.817 (Stati Uniti d'America) del 1949 (ref. Biol. Abst., *24*, 27607, 1950).

67 - Phelps, A. - Brevetto 2.473.818 (Stati Uniti d'America) del 1949 (ref. Biol. Abst., *24*, 27608, 1950).

68 - Pollard, H. L. e coll. - Brevetto 2.449.140 e 2.449.141 (Stati Uniti d'America) del 1948 (ref. Biol. Abst., *23*, 11506, 1949).

69 - Pollard, H. L. e coll. - Brevetti 2.449.142 e 2.449.143 (Stati Uniti d'America) del 1948 (ref. Biol. Abst., *23*, 11.507, 1949).

70 - Povolotskaya, K. L. - *Preparation of Riboflavin from Biological Medium*. Trudy, Vsesoyuz. Nauch. Issledovatel. Vitamin. Inst., *5*, 88, 1954 (ref. Chem. Abst., *51*, 8367i, 1957).

71 - Prescott, S. C. e Dunn, C. G. - *Industrial Microbiology*, pag. 218; Mc Graw-Hill Book Co. New York, 1959.

72 - Pridham, T. G. e Raper, K. B. - *« Ashbya gossypii » Its Significance in Nature and in the Laboratory*. Mycologia, *42*, 603, 1950.

73 - Pridham, T. G. e coll. - U.S. Dept. Agr. Bur. Agr. and Ind. Chem. Mimeografed Cir. Ser. AIC 271, 1950 (ref. Annual Review of Microbiology, 7, 458, 1953).

74 - Pridham, T. G. - *Microbial Synthesis of Riboflavin*. Econ. Bot., *6*, 185, 1952 (ref. Biol. Abst., *27*, 13485, 1953).

75 - Rastogi, M. K. e Coll. - *Production of Riboflavin by Fermentation with Eremothecium ashbyii*. J. Sci. Ind. Research (India), *18c*, 262, 1959 (ref. Chem. Abst., *54*, 16735d, 1960).

76 - Renaud, J. e Lachaux, O. - *Recherches sur la Formation de Lactoflavine à Partir de L' « Eremothecium ashbyii »; Culture sur Milieux Liquides*. Compt. Rend. Acad. Sci., *219*, 498, 1944.

77 - Ritter, W. - *Beitrag zur Kenntnis der Laktoflavinbildung durch « Eremothecium ashbyii » Guill.* Schweiz. Zeitschr. Path. u. Bakt., 7 (4), 370, 1944 (ref. Biol. Abst., *20*, 7416, 1946).

78 - Rodgers, N. E. e coll. - *Relation of Strain Variation and Culture History to the Synthesis of Riboflavin by « Clostridium acetobutylicum » in Whey*. J. Bacteriol., *51*, 569, 1946.

79 - Schopfer, W. H. - *Les Facteurs de Croissance pour Quelques Espèces de Candida et de Torulopsis (Biotine, Aneurine, Mesoinositol). La Biosynthèse de la Lactoflavine*. Compt Rend. Soc. de Physique et d'Hist. Nat. Geneve, *61*, 147, 1944.

80 - SCHOPFER, W. H. - *Les Besoins en Facteurs de Croissance de Vingt Trois Espèces et Variétés du Genre Candida. Le Production de Lactoflavine.* Compt. Rend. Soc. de Physique et d'Hist. Nat. Geneve, *61*, 231, 1944.

81 - SCHOPFER, W. H. - *La Biotine, L'Aneurine et le Meso-Inositol, Facteurs de Croissance pour « Eremothecium ashbyii » Guillermond. La Biosynthèse de la Riboflavine.* Helv. Chim. Acta, *27*, 1017, 1944.

82 - SCHOPFER, W. H. e KNÜSEL, F. - *Recherches sur la Biosynthèese de la Lactoflavine. Action du Zinc sur la Biosynthèse de cette Vitamine.* Schweiz. Z. Allgem. Pathol. u. Bakteriol., *19*, 659, 1956 (ref. Bull. Inst. Past., *55* (1), 1913, 1957).

83 - SHAVLOVSKI, G. M. e CHISTIAKOVA, V. S. - *Biosynthesis of Riboflavin by « Candida guilliermondii » Yeast, as Affected by Iron.* Dokladi. Akad. Naouk. SSSR, *3*, 887, 1956 (ref. Bull. Inst. Past., *56* (1), 461, 1958).

84 - SMILEY, K. L. e Coll. - *Biosynthesis of Riboflavin, « L. bulgaricus » Factor and Other Growth Factors.* Ind. Eng. Chem., *43*, 1380, 1951.

85 - SMILEY, K. L. e STONE, L. - Bacteriol. Proc., *21*, 1955 (ref. Annual Review of Microbiology, *10*, 171, 1956).

86 - STARKA, J. - *Properties of an « Eremothecium ashbyii » Strain Producing Riboflavin.* J. Gen. Microbiol., *17*, IV, 1957.

87 - TAKATA, R. e KIMURA, T. - *Studies on the Riboflavin Production by « Eremothecium ashbyii ».* J. Ferment. Tech., *28*, 103, 1950 (ref. Biol. Abst., *26*, 6551, 1952).

88 - TANNER, F. W. e Coll. - *Riboflavin Production by « Candida » Species.* Science, *101*, 180, 1945.

89 - TANNER, F. W. e VAN LANEN, J. M. - *Riboflavin Production by « Ashbya gossypii ».* J. Bacteriol., *54*, 38, 1947.

90 - TANNER, F. W. e Coll. - *Factors Affecting Riboflavin Production by « Ashbya gossypii ».* J. Bacteriol., *58*, 737, 1949.

91 - TOMOYEDA, M. e OBATA, Y. - *Mechanism of Microbiological Syntesis of Riboflavin by the Butyl. Alcohol-Acetone Organism.* J. Agric. Chem. Soc. (Giappone), *28*, 8, 1954 (ref. Chem. Abst., *50*, 6575f, 1956).

92 - TOMOYEDA, M. - *The Mechanism of Riboflavin Biosynthesis by Clostridium acetobutylicum.* Research Bull. Agr. Gifu Univ., *6*, 163, 1956 (ref. Chem. Abst., *50*, 9501b, 1956).

93 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». I-Investigations of Industrial Media.* Vitamins, *10*, 434, 1956 (ref. Chem. Abst., *50*, 17322d, 1956).

94 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». II-Some Conditions for the Culture.* Vitamins, *10*, 439, 1956 (ref. Chem. Abst., *50*, 17322e, 1956).

95 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». III-Feeding of the Nutrients.* Vitamins, *10*, 444, 1956 (ref. Chem. Abst., *50*, 17322g, 1956).

96 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». IV-Conditions of Steri-*

lization, Antifoam Agents and Contamination-Preventing Agents. Vitamins, *11*, 389, 1956 (ref. Chem. Abst., *51*, 15887a, 1957).

97 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». V-Differences in Riboflavin Production Owing to the Lot of Raw Materials.* Vitamins, *11*, 393, 1956 (ref. Chem. Abst., *51*, 15887b, 1957).

98 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». VI-Supplemental Investigation for Industrial Media.* Vitamins, *11*, 398, 1956 (ref. Chem. Abst., *51*, 15887c, 1957).

99 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». VII-Fermentation with 100 Liter Plant.* Vitamins, *12*, 24, 1957 (ref. Chem. Abst., *51*, 15887d, 1957).

100 - TSUKIHARA, K. e IZUMIYA, M. - *Industrial Production of Riboflavin by the Submerged Culture of « Eremothecium ashbyii ». VIII-Industrial Tests and Cost Estimates.* Vitamins, *12*, 31, 1957 (ref. Chem. Abst., *51*, 15887e, 1957).

101 - TSUKIHARA, K. e Coll. - *Cultivation of « Eremothecium ashbyii » on Cereal Germ in a Rotary Drum.* Vitamins, *12*, 40, 1957 (ref. Chem. Abst., *51*, 15059g, 1957).

102 - UNDERKOFLER, L. A. e HICKEY, R. J. - *Industrial Fermentations.* Vol. II, pag. 157; Chemical Publishing Co., New York, 1954.

103 - WEAVER, E. A. - *Enzyme Production.* Brevetto 2.744.050 (Stati Uniti d'America) del 1956 (ref. Chem. Abst., *50*, 11619e, 1956).

104 - WICKERHAM, L. J. e Coll. - *The Production of Riboflavin by « Ashbya gossypii ».* Arch. Biochem., *9*, 95, 1946.

105 - YAW, K. E. - *Production of Riboflavin by « Eremothecium ashbyii » Grown in a Synthetic Medium.* Mycologia, *44*, 307, 1952.